

Aus dem Pathologisch-Anatomischen Institut
der Universität Erlangen-Nürnberg

Direktor: Professor Dr. med. Volker Becker

Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen
zur organspezifischen Verteilung und
gewebsspezifischen Lokalisation von DAPI
(6-Amidino-2-(4-Amidinophenyl)Indol)
in der Maus

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt von
Friedrich August Wilhelm Schuhmacher
aus Schillingsfürst

1979 # 2 68

Aus dem Pathologisch-Anatomischen Institut
der Universität Erlangen - Nürnberg

Direktor: Professor Dr. med. Volker Becker

Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen
zur organspezifischen Verteilung und
gewebsspezifischen Lokalisation von DAPI
(6-Amidino-2-(4-Amidinophenyl)Indol)
in der Maus

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen - Nürnberg

vorgelegt von
Friedrich August Wilhelm Schuhmacher
aus Schillingsfürst

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan: Prof. Dr. med. Kersten
Referent: Prof. Dr. med. H. Schmidt
Korreferent: Prof. Dr. med. V. Becker

Tag der mündlichen Prüfung: 12.07.1979

EINLEITUNG

Die afrikanischen Trypanosomiasen sind auch heute noch in Afrika weit verbreitete Krankheiten der Nutztiere und des Menschen, bekannt unter dem Krankheitsbild z.B. der Nagana der Rinder bzw. der Schlafkrankheit. Die Verbreitung der afrikanischen Trypanosomiasen ist an das Vorkommen der die Trypanosomen übertragenden Tsetsefliegen gebunden und damit auf das tropische Afrika beschränkt (KNÜTTGEN, 1975). Bei den Trypanosomen handelt es sich um einzellige zu den Flagellaten zu rechnende Protozoen, die vorwiegend im Blut und in den Gewebs- und Lymphspalten parasitieren. Nach neueren Anschauungen befinden sich dabei die Erreger der menschlichen Trypanosomiasis *T. rhodesiense* und *T. gambiense* im Blut und in den Gewebsspalten der parenchymatösen Organe (LOSOS u. IKEDE; 1972), während die Vertreter der rinderpathogenen Trypanosomen - *T. congolense* und *T. vivax* - auf die periphere Blutbahn beschränkt zu sein scheinen.

Die Behandlung der menschlichen Schlafkrankheit stützt sich noch immer auf das in den zwanziger Jahren unseres Jahrhunderts entwickelte Germanin^R) (Suramin) und das in den vierziger Jahren entwickelte Pentamidin^R) (KNÜTTGEN, 1975). In neuerer Zeit wird daneben das zur Behandlung von Rindertrypanosomiasen verwendete Diamidin Berenil^R) (Diminazenaceturat) der Firma Hoechst aus Mangel an geeigneten Präparaten auch zur Behandlung der menschlichen Trypanosomen-Infektion herangezogen (KNÜTTGEN, 1975). Während mit Germanin^R), Pentamidin^R) und Berenil^R) bei der Behandlung des ersten Krankheitsstadiums der Schlafkrankheit recht gute Erfolge erzielt werden, stehen zur Behandlung des zweiten Krankheitsstadiums, in dem die Trypanosomen im ZNS zu finden sind (KNÜTTGEN, 1975), nur die relativ toxischen Arsenikalien Tryparsamid^R) und Melarsoprol^R) zur Verfügung, da Germanin^R), Pentamidin^R) und Berenil^R) die Blut-Hirnschranke nicht passieren.

Deshalb wäre es wünschenswert, eine Verbindung zu finden, die in der Früh- und Spätphase der Schlafkrankheit wirkt und nur geringe Nebenwirkungen zeigt.

Das in der vorliegenden Untersuchung verwendete, stark fluoreszierende Präparat mit der Versuchsnummer 102/198 6-Amidino-2-(4-Amidinophenyl)Indol mit der Kurzbezeichnung DAPI wurde von der Arbeitsgruppe von Professor Dann am Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie, Lehrstuhl für Angewandte Chemie, der Universität Erlangen in den sechziger Jahren synthetisiert (DANN u. Mitarb.; 1970). In Versuchen an infizierten Labortieren zeigte es eine spezifische Wirkung insbesondere gegen *T. rhodesiense* und *T. congolense* (FINK u. DANN; 1974). In Versuchen an infizierten Affen zeigte ein weiteres neuartiges Diamidin verwandter Struktur aus der gleichen Arbeitsgruppe eine spezifische Wirkung auch auf das zweite Stadium der Erkrankung (RAETHER u. SEIDENATH; 1976). Dies wäre unter den Bedingungen im tropischen Afrika, wo eine Unterscheidung zwischen Früh- und Spätphase, wie sie die Therapie mit Germanin^{R)}, Pentamidin^{R)} und Berenil^{R)} voraussetzt, oft nur schwierig zu treffen ist, ein deutlicher Vorteil.

Neben seinen guten trypanociden Eigenschaften zeigt das in der Veterinärmedizin verwendete Berenil^{R)} bei Hunden Läsionen des ZNS, die mit starker neurologischer Symptomatik einhergehen und die seiner offiziellen Einführung in die Humanmedizin bisher im Wege stehen (SCHMIDT, KADUK u. FINK; 1977). Ähnliche Erscheinungen ergaben auch Untersuchungen mit DAPI an Hunden, sowie an Meerkatzen und Katzen (SCHMIDT, KADUK u. FINK; 1977). Beim Hund äußerten sich die toxischen Nebenwirkungen auf das ZNS bei vierfach überhöhter Dosis von 102/198 klinisch in Form von komatösen Zuständen und Streckkrämpfen, die sich pathologisch-anatomisch vor allem in vakuoligen Gefäßwandauflockerungen, fibrinoiden Gefäßwandnekrosen, z.T. mit

Lichtungsthrombosen und starker Wandzellproliferation, ähnlich einer produktiven Arteriitis, zeigten. Vorzugssitz dieser Nekrosen waren Stamm- und Kleinhirn.

Im Zusammenhang mit der prophylaktischen Anwendung von Diamidinen, sowie in Bezug auf die Frage einer Wirkung in der Spätphase der menschlichen Schlafkrankheit, wie auch im Hinblick auf die beobachtete sogenannte neurotoxische Wirkung der Diamidine, stellte sich die Frage nach der spezifischen Verteilung, Verweildauer und Lokalisation von Diamidinen in den Geweben und Organen und nach ihrer Ausscheidung.

Chemisch analytische Untersuchungen an der Maus von Kaliwoda (KALIWODA, 1976) ergaben, daß nach intraperitonealer Injektion von 10 mg/kg der Substanz 102/198 eine rasche Invasion des Diamidins ins Blut mit Serummaxima nach 0,25 Stunden einsetzt. Die Elimination erfolgt zweiphasig mit Halbwertszeiten von 0,20 bis 0,30 Stunden in der ersten ungefähr einstündigen Phase und mit einer Halbwertszeit von 4 Stunden in der zweiten Phase. Eine hohe Anreicherung wurde in Leber und Nieren gefunden mit Gewebekonzentrationen um $60 \mu\text{g/g}$ in der Leber und $100 \mu\text{g/g}$ in den Nieren nach 24 Stunden; nach 14 Tagen betrugen die entsprechenden Konzentrationen 4 bis $10 \mu\text{g/g}$ und $16 \mu\text{g/g}$. Es ergab sich ferner eine starke Anreicherung in Leber und Nieren, wobei die Konzentrationen nach 24 Stunden 3000- bis 6000fach höher waren als die des Serums. Die Substanzkonzentration in Leber und Nieren lag 20- bis 50fach über der im Gehirn. Nach 14 Tagen waren erst 54 % der applizierten Menge ausgeschieden. Die Ausscheidung erfolgte zum größten Teil über den Darm. Bei einer orientierenden Untersuchung an einem Kalb konnte eine gegenüber der Maus wesentlich verzögerte Ausscheidung festgestellt werden. Die Gesamtausscheidung betrug hier nach 79 Tagen ungefähr 18 % der applizierten Substanzmenge (KALIWODA, 1976).

Die gute Fluoreszenz von DAPI bietet die Möglichkeit, über die chemisch analytischen Verfahren hinaus die Lokalisation der trypanociden Substanz in den einzelnen Geweben der Organe der Maus fluoreszenzmikroskopisch festzustellen, um auf diese Weise weitere Aufschlüsse über Beziehungen hinsichtlich der trypanociden Wirkung wie auch der Toxizität zu erhalten. Aus diesem Grunde schien es sinnvoll, Mäuse mit wirksamen trypanociden Dosen zu behandeln und fluoreszenzoptische Untersuchungen an den Organen der Tiere durchzuführen.

UNTERSUCHUNGSGUT UND METHODE

Für die Untersuchungen wurden Mäuse des Stammes NMRI/orig. Kißlegg aus den medizinischen Versuchsanstalten S. Ivanovas, Kißlegg Allgäu, verwendet. Die Mäuse erhielten als Standard-Diät Altromin^R der Firma Lage/Lippe und Wasser ad libitum. Sie wurden bei täglich 12 h künstlichem Licht, bei einer Raumtemperatur von 23 - 25°C und bei 55 - 65 % relativer Luftfeuchte gehalten. Für die Versuche wurden weibliche Tiere mit einem Gewicht von ca. 25 - 30 g zu Versuchsbeginn verwendet, die während des Versuchs in Makrolon^R-Käfigen von 400 cm² Bodenfläche gehalten wurden; der Boden der Käfige wurde mit Sägespänenstreu ausgelegt.

Die Versuchsverbindung 102/198 (6-Amidino-2-(4-Amidino-phenyl)Indol), DAPI, wurde den Mäusen i.p. zugeführt. Für 102/198 wurde eine Dosierung angestrebt, die den Nachweis über einen möglichst langen Zeitraum erhalten sollte. Daher wurde eine relativ hohe Dosierung von 10 mg/kg gewählt. Die Versuchsverbindung wurde in einer Konzentration verabreicht, die die Applikation der genannten Dosis in 0,1 ml pro 10 gKG des Versuchstieres erlaubte. Die Dosisangabe bezieht sich auf den Basenanteil des Diamidinsalzes; dieser beträgt 60.6 %. Die Injektionslösung wurde mit destilliertem Wasser unmittelbar vor der Injektion hergestellt. Vor der Behandlung wurden die Tiere gewogen. Zur Injektion wurden Einmal-Tuberkulinspritzen, Teilung 0,01 ml, und Kanülen No. 20 verwendet. Insgesamt wurden 30 Tiere innerhalb von 30 min. gespritzt, wobei die ersten 6 Tiere, die nach 10', 30' und 1 h getötet wurden, getrennt gehalten wurden. Je 2 Mäuse wurden nach 10', 30', 1 h, 2 h, 6 h, 12 h, 24 h, 2 d, 7 d, 14 d, 21 d, 28 d, 35 d, 42 d und 49 d durch Genickschlag getötet. Das getötete Tier wurde mit Stecknadeln auf eine Paraffinplatte gespannt. Sodann wurden Bauch- und Brustraum geöffnet und Leber, Niere, Pankreas, in einigen Fällen Dünn-

darm, Lunge und Herzmuskel entnommen. Zur Gewinnung eines Skelettmuskelpräparates wurde von beiden Hinterbeinen das Fell abgezogen und Gewebe aus der Oberschenkelmuskulatur entnommen. Da man die Lymphknoten makroskopisch nur schwer ausmachen konnte, wurde das in der lateralen Halsregion gelegene Gewebe zusammen mit der Parotis entfernt. Die Haut entstammte dem Brustfellbereich. Zur Freilegung des Gehirns wurde das Kopffell hinter den Ohren aufgeschnitten und nach vorne gezogen. Mit einer Schere wurde die Kopfdecke zwischen den Augenhöhlen und von diesen seitlich bis zu den Ohren aufgeschnitten, so daß sie sich nach hinten aufklappen ließ. Das nun freiliegende Gehirn wurde ganz entnommen. Die Organe eines Tieres wurden zur Hälfte in 5 % Formalinlösung fixiert, zur anderen Hälfte in Plastikgefäßen bei -18°C tiefgefroren. Zwei Mäuse wurden unbehandelt getötet und dienten zur Kontrolle für die mikroskopischen Untersuchungen. Nur die formalinfixierten Organe wurden fluoreszenzmikroskopisch weiterverarbeitet. Die tiefgefrorenen Organe eigneten sich ebenfalls zur Fluoreszenzmikroskopie, allerdings konnten am Gefriermikrotom nur $10\text{ }\mu$ dicke Schnitte hergestellt werden. Die formalinfixierten Organe wurden in üblicher Weise paraffiniert geschnitten auf Objektträger aufgezogen, die zuvor mit 3 %iger Gelatine dünn bestrichen worden waren, und entparaffiniert mit Eukitt eingedeckt; die Schnitte hatten eine Dicke von ca. $4\text{ }\mu$. Je ein Organschnitt wurde zur Kontrolle mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt.

Es wurde das ZEISS Fluoreszenzmikroskop mit einer OSRAM Quecksilber-Hochdrucklampe (OSRAM HBO 200 W) als Lichtquelle benutzt. Wir mikroskopierten mit Auflichtfluoreszenz. 102/198 besitzt bei $\lambda = 360\text{ nm}$ das Absorptionsmaximum und bei $\lambda = 480\text{ nm}$ das Emissionsmaximum (KALI-WODA, 1976). Es wurden daher wahlweise als Erregerfilter die ZEISS Filter UG1 bzw. BP 365/11 in Kombination mit den Sperrfiltern LP 418 bzw. BP 470/95 verwendet. Die verschiedenen Filterkombinationen verdanken wir Herrn Dr. Trapp, Firma ZEISS. Die Präparate wurden bei 8facher

Okularvergrößerung mit Neofluaren der Objektivstärke 16x (Ap. 0,4), 25x (Ap.0,6) und 63x (Ap. 0,9) betrachtet.

Fluoreszenzaufnahmen im Kleinbildformat wurden von Parotis, Gehirn, Pankreas, Leber, Niere und Skelettmuskel gemacht. Es wurde mit dem Ektachrome-Highspeed-Color-Slide-Film (KODAK^R) (DIN 27, ASA 400) bei verschiedenen Objektvergrößerungen fotografiert. Die Belichtungszeiten betrugen bei der Filterkombination UG1 + LP 418 ca. 4', bei der Kombination BP 365/11 + BP 470/95 ca. 8'.

UNTERSUCHUNGSERGEBNISSE

I. Vorbemerkungen

(1) Fluoreszenzmikroskopische Eigenschaften von 102/198.

Für 102/198 konnten keine fluoreszierenden Metaboliten festgestellt werden (KALIWODA, 1976). Bei der Filterkombination UG1 + LP 418 zeigte sich in den meisten Organen eine starke Autofluoreszenz, die im Zytoplasma von gelbgrüner und im Kern von blaugrüner Farbe war.

Die Filterkombination BP 365/11 + BP 470/95 erzeugte nur emittierte Fluoreszenz von $\lambda > 470$ nm und schluckte somit einen großen Teil der natürlichen Autofluoreszenz; natürliche Fluoreszenz war von tiefblauer Farbe. Die spezifische Fluoreszenz leuchtete bei UG1 + LP 418 intensiv gelb, sowohl in den Kernen als auch im Zytoplasma; bei BP 365/11 + BP 470/95 leuchtete die spezifische Fluoreszenz im Kern und Zytoplasma hellblau bis weiß. Die Wahl des Fixierungsmittels sowie die Stoffe, die zur Eindeckung des histologischen Schnittes benützt wurden, hatten keinen Einfluß auf die spezifische Fluoreszenz; die durch diese Stoffe möglicherweise emittierte Fluoreszenz konnte durch die gewählten Filterkombinationen ausgeschaltet werden. Die noch folgenden Beschreibungen der Fluoreszenz in den einzelnen Geweben schließt die Autofluoreszenz nicht ein.

(2) Zellulärer Ort der Fluoreszenz

Der trypanocide Effekt der Diamidine wurde an einer Vielzahl von Enzymen und Enzymsystemen untersucht. Zusammenfassungen der Wirkungen auf Enzymsysteme der Atmung, der Glykolyse, des Proteinmetabolismus sowie des Lipid-, Nukleinsäure- und Nukleotidmetabolismus werden bei HAWKING und WILLIAMSON gegeben (zit. nach KALIWODA). Die bei physiologischem pH-Wert als Bis-Kationen vorliegenden Diamidine besitzen eine starke Affinität zu anionischen bzw. elektronegativen Strukturen wie Proteinen,

Nukleinsäuren, Phosphorlipiden, Mucopolysacchariden, Neuraminsäure und ähnlichen. Durch 102/198 hervorgerufene Fluoreszenz konnte hauptsächlich in den Kernen der parenchymatösen Organe, des Bindegewebes und der Gefäßendothelien festgestellt werden. Diffuse Fluoreszenz des Zytoplasma wurde in den Zellen der Rindentubuli der Niere, den Leberepithelien und den Gliazellen im Stratum moleculare der Großhirnrinde beobachtet. Granuläre Fluoreszenz zeigte sich vor allem im Plexusepithel, in Herz- und Skelettmuskulatur. Vermutlich wird hier 102/198 in den Mitochondrien gebunden.

(3) Zeitpunkt des Auftretens und Dauer der Fluoreszenz
KALIWODA beobachtete bei 102/198 nach i.p. Applikation von 10 mg Substanz pro kg KG eine rasche Invasion ins Blut. Maximale Serumkonzentrationen werden bereits nach 0,25 h erreicht. Nach 24 h zeigt sich eine starke Anreicherung in Leber und Niere, die ungefähr das 3000-6000fache der Serumkonzentration ausmacht. In der Niere ist die Substanzkonzentration durchwegs höher als in allen anderen Organen. 102/198 wird bevorzugt über die Faeces ausgeschieden. Nach 9,5 d sind bereits 50 % der applizierten Dosis ausgeschieden, nach 16 d bereits 65 % (KALIWODA, 1976). Schon nach 10' wurde spezifische Fluoreszenz in Leber und Niere beobachtet. Nach 30' fluoreszierten alle Organe intensiv, außer Lunge und Lymphknoten. Noch nach 21 d wurde in allen Organen, außer in Parotis, spezifische Fluoreszenz beobachtet. Niere, Leber, Gehirn, Herz- und Skelettmuskulatur fluoreszierten deutlich nach 28 d. Vereinzelte Fluoreszenz in den Gefäßendothelien der Leber konnte noch nach 35 d gesehen werden.

ERGEBNISSE

Die Intensität der Fluoreszenz ließ sich nur subjektiv beurteilen. Jedoch ließ sich generell im Bindegewebe und in fast allen parenchymatösen Organen, außer in Milz und Lunge, starke Fluoreszenz beobachten, im Bindegewebe bis zu 28 d, im Parenchym bis zu 14 d. In Niere und Leber wurde die Fluoreszenz am intensivsten gesehen. Im einzelnen ließ sich folgendes feststellen:

(1) Leber (Abb. 1, Tab. 1)

In der Leber war spezifische Fluoreszenz in den Epithelkernen schwach und vereinzelt nach 10' vorhanden, nach 30' sehr intensiv und nach 14 d nicht mehr zu beobachten. Im Zytoplasma der Epithelzellen war Fluoreszenz nur bis zu 6 h nachweisbar. Fluoreszenz in den Kupfferschen Sternzellen leuchtete erst nach 6 bzw. 12 h, nahm stetig an Intensität zu, erreichte nach 14 d ein Maximum und konnte noch nach 28 d beobachtet werden. Die Kerne der Gefäßwandzellen zeigten bis zu 25 d gleichbleibend deutliche Fluoreszenz. Die Kerne des Kapselgewebes leuchteten nur bis zu 1 h, was wahrscheinlich durch die i.p. Applikation der Substanz hervorgerufen wurde.

(2) Niere (Abb. 2 und 3, Tab. 2)

In der Niere war die Fluoreszenz im Rindenbereich erheblich intensiver und konzentrierter als im Markbereich (Abb. 2). Kernfluoreszenz der Glomerulumkapillaren (Abb. 3) zeigte sich schwach und vereinzelt nach 10', nach 30' diffus, zwischen 2 und 12 h intensiv und nach 2 - 7 d nur noch schwach. Zytoplasmatische Fluoreszenz der Rindentubuli zeigte sich bis 6 h. Die Kerne der Rindentubuli fluoreszierten sehr intensiv bis zu 21 d, schwach noch nach 28 d. Die Kerne der Marktubuli leuchteten nach 30' stark, nach 14 d an Intensität abnehmend und vereinzelt noch bis 28 d. Kernfluoreszenz der Sammelrohre trat erst nach 12 h auf und konnte noch nach 28 d beobachtet werden.

(3) Pankreas (Abb. 4, Tab. 3)

Im endokrinen Teil des Pankreas war die spezifische Fluoreszenz intensiver und länger feststellbar als im übrigen exkretorischen Pankreas. Nach 30' zeigte sich starke Fluoreszenz in den Epithelkernen der Langerhansschen Inseln; sie war nach 12 h am intensivsten und bis 21 d vorhanden (vergl. Blutzuckeranstieg nach hohen Dosen von Pentamidin^R und Stilbamidin^R) (KALIWODA, 1976). Die Fluoreszenz des Zytoplasmas in den exkretorischen Endstücken und Ausführungsgängen leuchtete nach 30' stark und schwach bis 2 h. Die Kerne fluoreszierten intensiv nach 30', gleichbleibend bis zu 12 h und schwach nach 14 d. Die Kerne des Kapillarendothels leuchteten gleichmäßig bis zu 21 d.

(4) Parotis (Tab. 4)

Eine bemerkenswerte homogene Fluoreszenz beobachtete man in der Parotis. Die Kerne der Bindegewebskapsel leuchteten intensiv nach 30'. Die Fluoreszenz nahm stetig ab und war nach 14 d nicht mehr vorhanden. Die Kerne der mukösen sowie der serösen Endstücke zeigten nach 30' gute Fluoreszenz, die bis zu 6 h gleichbleibend intensiv war und allmählich abnehmend nach 7 d nicht mehr zu beobachten war. Schwache Fluoreszenz konnte in den Kernen der Ausführungsgänge nach 30' bis zu 2 d nachgewiesen werden. Auffallend war die sehr intensive Fluoreszenz der Fettzellkerne, die bis zu 14 d gleichmäßig stark leuchteten und nach 28 d fehlte.

(5) Gehirn (Abb. 5, Tab. 5)

An den Nervenzellen war Fluoreszenz niemals nachzuweisen. Auch die Gliazellen zeigten keine Fluoreszenz. Eine Ausnahme machten die Gliazellen der inneren und äußeren Hirnoberflächen (Stratum moleculare und Subependym), sie fluoreszierten nach 1 h und zeigten nach 14 d noch schwache Fluoreszenz. Auffallend war die bereits nach 30' vorhandene

intensive Fluoreszenz in den Kernen des Plexusepithels, die bis zu 21 d gleich intensiv und etwas schwächer noch nach 28 d zu beobachten war. Schwache granuläre zytoplasmatische Fluoreszenz der Plexusepithelzellen zeigte sich nach 30' und konnte bis 12 h, vereinzelt bis zu 24 h festgestellt werden. Die Kerne der Gefäßendothelzellen fluoreszierten stark nach 60', intensiv nach 6 h bis zu 7 d, allmählich abnehmend bis zu 28 d. Die Kerne der Leptomeninx leuchteten noch nach 28 d.

(6) Herzmuskel (Tab. 6)

Die Kerne der glatten Muskelzellen des Herzmuskels zeigten ab 30' bis zu 21 d durchgehend starke Fluoreszenz, vereinzelt schwache Fluoreszenz nach 28 d. Extranukleäre granuläre Fluoreszenz konnte man gut bis 21 d, schwächer und diffuser bis 28 d beobachten; vermutlich war die granuläre Fluoreszenz in den Mitochondrien lokalisiert. Die Kerne der Gefäßendothel- und Bindegewebszellen fluoreszierten deutlich bis zu 21 d.

(7) Skelettmuskel (Abb. 6, Tab. 7)

Kernfluoreszenz der quergestreiften Muskelzellen konnte nach 30' gesehen werden; intensiv fluoreszierten die Kerne nach 24 h bis zu 14 d, nach 28 d war keine Fluoreszenz mehr zu beobachten. Extranukleäre granuläre Fluoreszenz konnte nach 60' diffus gesehen werden, 2 d war sie homogen und intensiv vorhanden und nach 28 d völlig verschwunden. Die Kernfluoreszenz der Gefäßendothelien und Bindegewebszellen leuchteten 21 d lang.

(8) Milz und Lymphknoten

Die Fluoreszenz der Zellkerne der bindegewebigen Kapsel der Milz war 21 d lang zu sehen. Vereinzelt konnte spezifische granuläre Fluoreszenz in der Umgebung der Lymphfollikel des Lymphknotens und in der roten und weißen Milzpulpa beobachtet werden; vermutlich handelte es sich um mit 102/198 beladene Makrophagen.

(9) Lunge

Das Lungengewebe zeigte keine besondere spezifische Fluoreszenz. In der Umgebung der Bronchien und Bronchioli konnte diffus granuläre Fluoreszenz 28 d lang festgestellt werden.

(10) Dünndarm

Die Fluoreszenz im Dünndarm wurde nur 21 d lang beobachtet. Die Kerne der Epithelzellen fluoreszierten nach 30' stark, nur noch schwach nach 2 d. Nach 14 und 21 d zeigte sich vereinzelt Fluoreszenz in der Umgebung der Lymphfollikel im Propriabindegewebe. Kernfluoreszenz der glatten Längsmuskulatur zeigte sich nach 1 h, der Tunica serosa bereits nach 30' und war 21 d lang zu sehen.

(11) Haut

Keine Fluoreszenz wurde in der Epidermis gefunden. Die Kerne des Fettgewebes und des subepidermalen Bindegewebes fluoreszierten stark noch nach 21 d. Schwache Fluoreszenz in den Kernen der Muskelzellen wurde nach 60' beobachtet, zwischen 12 h und 14 d intensiv und schwach nach 21 d. Die Gefäßendothelkerne fluoreszierten gleichmäßig stark 21 d lang. Schwache Fluoreszenz konnte in den Epithelkernen der Haarwurzeln, Schweiß- und Duftdrüsen nach 2 h und bis zu 14 d gesehen werden.

DISKUSSION DER BEFUNDE

Nach intraperitonealer Applikation der Versuchsverbindung 102/198 findet sich eine starke Anreicherung der Substanz in den Epithelzellen der Leber und in den Rindentubulizellen der Niere bereits nach 30'. Schon nach 1 h findet man eine intensive Anreicherung der Verbindung in allen parenchymatösen Organen, außer in Milz und Lunge. In der Niere fiel auf, daß sich in den Tubuli erster Ordnung eine weitaus stärkere granuläre Fluoreszenz zeigte als in den Rindentubuli zweiter Ordnung; dieser Unterschied konnte auch noch nach 21 d deutlich festgestellt werden. Dies könnte auf eine möglicherweise stattfindende Rückresorption in den Tubuli erster Ordnung hinweisen. In der Niere fiel weiterhin eine deutlich verminderte Fluoreszenz der Bindegewebszellen der Glomerulikapillaren auf.

In der Leber zeigte sich mit zunehmender Untersuchungsdauer eine intensive Anreicherung der Substanz in den Kupfferschen Sternzellen; die Fluoreszenz der Leberepithelzellen nahm während des zeitlichen Untersuchungskontinuums deutlich ab. Vielleicht könnte man den Kupfferschen Sternzellen eine resorptive Funktion der Versuchsverbindung aus dem Dünndarm zusprechen, obgleich in den Zellen der Gallengangsgänge und -kapillaren sowie im Dünndarm keine deutliche Fluoreszenz zu späteren Zeitpunkten zu beobachten war.

Auffallend stark fluoreszierten die Langerhansschen Inseln des Pankreas. Von Stilbamidin^(R) und Pentamidin^(R) sind bei höherer Dosierung Blutzuckeranstiege bekannt.

Sehr deutlich ist die schwache Gesamtfluoreszenz im Gehirn im Vergleich zur Fluoreszenz in Niere und Leber. Die Fluoreszenz findet man vor allem in dem mesenchymalen Anteil der Gewebe, also in den Meningen, dem Plexusepithel und den Gefäßen. Schwache, aber dennoch deutliche Fluoreszenz findet sich in den Gliazellen der äußeren und inneren Oberflächen des Gehirns. Die Versuchsverbindung

gelangt wahrscheinlich durch das Plexusepithel in den Liquor und erreicht die Gliazellen der obersten Schichten mittels Diffusion. Hierbei wäre es wichtig weiter abzuklären, ob sich bei subokzipitaler Applikation die Substanz intensiver in den Nerven und Gliazellen nachweisen läßt und ob bei infizierten Tieren die Durchlässigkeit der Blut-Hirnschranke verändert ist, zumal das Gehirn den Hauptort der menschlichen Schlafkrankheit und den Hauptort der toxischen Nebenwirkungen von 102/198 bei Hunden darstellt (SCHMIDT, KADUK u. FINK; 1977).

Im Herzmuskel läßt sich die Verbindung in den Kernen der Muskelzellen des Bindegewebes und des Sarkolemmns nachweisen, wobei hier vor allem nach längerer Untersuchungszeit intensive granuläre Fluoreszenz im Sarkoplasma zu beobachten ist. Der Skelettmuskel zeigt ein ähnliches Bild. Bei lichtmikroskopischer Kontrolle konnten diese Veränderungen, die sich elektronenmikroskopisch als Mitochondriose (sekundäre Kardiomyopathie) darstellen (KADUK, SCHMIDT u. FINK; 1978), bei der angegebenen Dosierung nicht beobachtet werden.

Über den ganzen Untersuchungszeitraum zeigte die Substanz eine starke Affinität zu den Zellkernen des Mesenchyms, also den Fettgewebs- und Bindegewebszellen einschließlich der Gefäße.

Aufgrund der Untersuchungsergebnisse läßt sich ableiten, daß die Versuchsverbindung 102/198 eine starke Affinität zu den Kernen des Mesenchyms und der parenchymatösen Organe außer Lunge und Milz, in Herz- und Skelettmuskel wahrscheinlich auch zu den Mitochondrien zeigt. In der Niere und Leber ist die Affinität am intensivsten. Offen bleibt, ob sich die Substanz tatsächlich nur dort befindet, wo sie durch Fluoreszenz angezeigt wird, da Fluoreszenzlöschung bei starker Bindung des Diamidins auftreten kann.

Werden die durch Fluoreszenzmikroskopie gewonnenen Befunde

mit chemisch quantitativ gewonnenen Befunden verglichen, so läßt sich die relativ lange Verweildauer der Versuchsverbindung (nach 14 Tagen sind noch 46 % der applizierten Substanz vorhanden (KALIWODA, 1976)) durch die höchstwahrscheinlich in der Niere stattfindende Rückresorption erklären. In Niere und Leber wurden die höchsten Organkonzentrationen von 102/198 gefunden; die Fluoreszenz wurde auch in diesen Organen ebenfalls am intensivsten empfunden, jedoch wurde die Fluoreszenzintensität nicht mit objektiven Kriterien erfaßt.

Die bei Infektion mit Trypanosomen hervorgerufenen Schädigungen betreffen vor allem das Gehirn. Von einem für die Therapie der Schlafkrankheit geeigneten Medikament muß eine lange Verweildauer und vor allem eine gute Passierbarkeit der Blut-Hirnschranke gefordert werden. Da 102/198 höchstwahrscheinlich über das Plexusepithel in den Liquor sezerniert wird, würde somit eine wesentliche Forderung erfüllt sein. Die relativ lange Verweildauer im Organismus - nach 14 Tagen sind immerhin noch 46 % der applizierten Substanz vorhanden - ist als Grundlage für eine mögliche Prophylaxe und Therapie zu betrachten.

ZUSAMMENFASSUNG

Das trypanocide, fluoreszierende Diamidin 102/198, 6-Amidino-2-(4-amidinophenyl)indol wurde Mäusen i.p. appliziert. Die organ- und gewebsspezifische Verteilung der Substanz wurde fluoreszenzmikroskopisch beobachtet.

102/198 zeigt eine starke Affinität zu den Kernen des Mesenchyms und der parenchymatösen Organe, außer Lunge und Milz, im Herz- und Skelettmuskel wahrscheinlich auch zu den Mitochondrien.

In Niere und Leber wurde die Fluoreszenz am stärksten und längsten gesehen. In den Nierentubuli 1. Ordnung zeigte sich eine weitaus intensivere Fluoreszenz als in den Tubuli 2. Ordnung. Die Fluoreszenz in den Kupfferschen Sternzellen der Leber nahm mit zunehmender Untersuchungsdauer zu, die der Leberepithelzellen deutlich ab. Die Langerhansschen Inseln des Pankreas fluoreszierten stark. Im Herzmuskel wurde nach längerer Untersuchungsdauer eine intensive granuläre Fluoreszenz im Sarkoplasma nachgewiesen. Auffallend war die schwache Gesamtfluoreszenz des Gehirns. In den Nervenzellen konnte Fluoreszenz nicht nachgewiesen werden. Fluoreszenz wurde in den Zellen der Meningen und in den Gliazellen der äußeren und inneren Oberflächen gesehen. Frühe und intensive Fluoreszenz zeigten die Kerne des Plexusepithels. Aufgrund dieser letzten Befunde ist anzunehmen, daß die Substanz die Blut-Hirn-Schranke nicht passiert, daß sie aber die Blut-Liquor-Schranke passieren und über den Liquor in die Hirnsubstanz im Bereich der inneren und äußeren Oberflächen diffundieren kann.

Eine Heilwirkung der Substanz im Spätstadium der Schlafkrankheit ist nach diesen Befunden, wenn überhaupt, nur im geringen Grade zu erwarten.

Tabelle 1: Fluoreszenz in den Zellen der Leber

	Kapselzellen		Epithelzellen		Epithelzellen		Kupffersche Sternzellen		Gefäßendothellen	
	Kern		Zytoplasma		Kern		Kern		Kern	
10'	+		Ø		+		Ø		Ø	
30'	++		+++		+++		Ø		+	
1h	+		+++		+++		Ø		+	
2h	Ø		++		+++		Ø		+	
6h	Ø		+		+++		(+)		+	
12h	Ø		Ø		+++		(+)		+	
24h	Ø		Ø		+++		++		+	
2d	Ø		Ø		+++		++		+	
7d	Ø		Ø		++		++		+	
14d	Ø		Ø		Ø		+++		+	
21d	Ø		Ø		Ø		++		+	
28d	Ø		Ø		Ø		+		+	
35d	Ø		Ø		Ø		Ø		+	
42d	Ø		Ø		Ø		Ø		Ø	
49d	Ø		Ø		Ø		Ø		Ø	

Tabelle 2: Fluoreszenz in den Zellen der Niere

	Rindentubuli		Rindentubuli		Glomerulum- kapillaren		Marktubuli		Sammelrohre	
	Zytoplasma	Kern	Kern	Kern	Kern	Kern	Kern	Kern	Kern	Kern
10'	∅	∅	+	+	∅	∅	∅	∅	∅	∅
30'	++	+++	+	+	++	++	++	++	∅	∅
1h	++	+++	+(+)	+	++	++	++	++	∅	∅
2h	++	+++	++	++	++	++	++	++	∅	∅
6h	+	+++	++	++	++	++	++	++	∅	∅
12h	∅	+++	++	++	++	++	++	++	+	+
24h	∅	+++	+	+	++	++	++	++	+	+
2d	∅	+++	+	+	++	++	++	++	+	+
7d	∅	+++	+	+	++	++	++	++	+	+
14d	∅	+++	∅	∅	++	++	++	++	+	+
21d	∅	+++	∅	∅	++	++	++	++	+	+
28d	∅	+	∅	∅	++	++	++	++	+	+
35d	∅	∅	∅	∅	++	++	++	++	+	+
42d	∅	∅	∅	∅	++	++	++	++	∅	∅
49d	∅	∅	∅	∅	++	++	++	++	∅	∅

Tabelle 3: Fluoreszenz in den Zellen des Pankreas

	Langerhanssche Inseln		Exkretorische Endstücke und Ausführungsgang		Exkretorische Endstücke und Ausführungsgang		Gefäßendothelien	
	Kern	Zytoplasma	Kern	Zytoplasma	Kern	Zytoplasma	Kern	Zytoplasma
10'	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
30'	++	++	+++	++	+++	++	++	++
1h	+++	+	+++	+	+++	++	++	++
2h	+++	+	+++	+	+++	++	++	++
6h	+++	∅	+++	∅	+++	++	++	++
12h	+++	∅	+++	∅	+++	++	++	++
24h	++	∅	+++	∅	+++	++	++	++
2d	++	∅	+++	∅	+++	++	++	++
7d	++	∅	+++	∅	+++	++	++	++
14d	+(+)	∅	+++	∅	+++	++	++	++
21d	+	∅	+++	∅	+++	++	++	++
28d	∅	∅	+++	∅	+++	++	++	++
35d	∅	∅	+++	∅	+++	++	++	++
42d	∅	∅	+++	∅	+++	++	++	++
49d	∅	∅	+++	∅	+++	++	++	++

Spezifische Fluoreszenz in den Langerhansschen Inseln intensiver und länger feststellbar als im übrigen exkretorischen Pankreas!

Tabelle 5: Fluoreszenz in den Zellen des Gehirns

	Gliazellen der inneren und äußeren Hirn- oberflächen	Pia mater	Plexusepithel	Plexusepithel	Gefäßendothelien
	Zytoplasma		Zytoplasma Granula	Kern	Kern
10'	∅	∅	∅	∅	∅
30'	∅	++	+	+++	∅
1h	++	++	+	+++	++
2h	+++	++	+	+++	++
6h	++	++	+	+++	+++
12h	++	++	+	+++	+++
24h	++	++	(+)	+++	+++
2d	++	++	∅	+++	+++
7d	++	++	∅	+++	+++
14d	+	++	∅	+++	++
21d	∅	++	∅	+++	+
28d	∅	+	∅	++	+
35d	∅	∅	∅	∅	∅
42d	∅	∅	∅	∅	∅
49d	∅	∅	∅	∅	∅

Tabelle 6: Fluoreszenz in den Zellen des Herzens

	Zellkern	Sarkolemm	Bindegewebszellen Kern
10'	∅	∅	∅
30'	++	+	+++
1h	++	+	+++
2h	+++	+	+++
6h	+++	+(+)	+++
12h	+++	++	+++
24h	+++	++	+++
2d	+++	++	+++
7d	+++	+++	+++
14d	+++	++	+++
21d	++	++	+++
28d	(+)	(+)	∅
35d	∅	∅	∅
42d	∅	∅	∅
49d	∅	∅	∅

Tabelle 7: Fluoreszenz in den Zellen der Muskulatur

	Zellkern	Sarkolemm	Bindegewebszellen Kern
10'	∅	∅	∅
30'	+	∅	+++
1h	+(+)	+	+++
2h	+	+	+++
6h	+(+)	+	+++
12h	++	+(+)	+++
24h	+++	++	+++
2d	+++	+++	+++
7d	+++	+++	+++
14d	+++	+++	+++
21d	++	+++	+++
28d	(+)	∅	(+)
35d	∅	∅	∅
42d	∅	∅	∅
49d	∅	∅	∅



Abb. 1: Leber mit starker Fluoreszenz der Epithelkerne

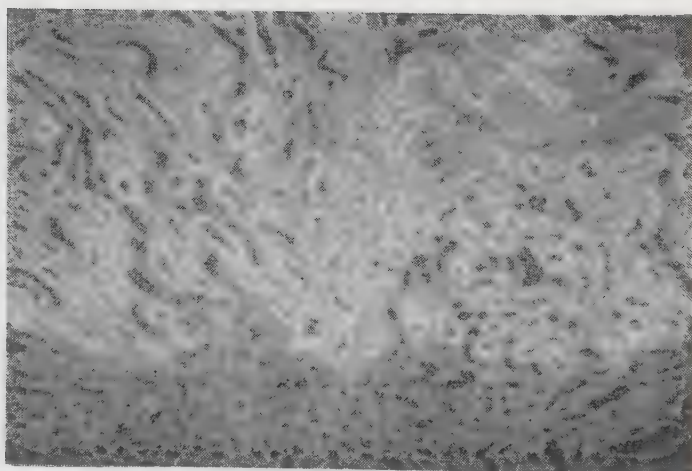


Abb. 2: Starke Fluoreszenz der Tubuli, besonders
der Hauptstücke

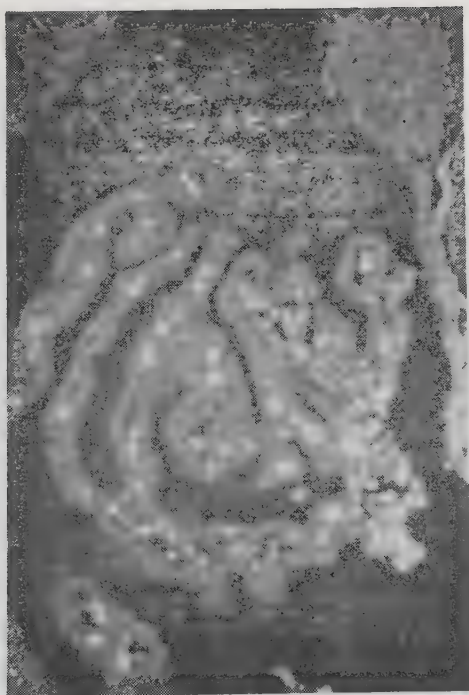


Abb. 3: Fluoreszenz der Zellkerne der Glomeruluskapillaren

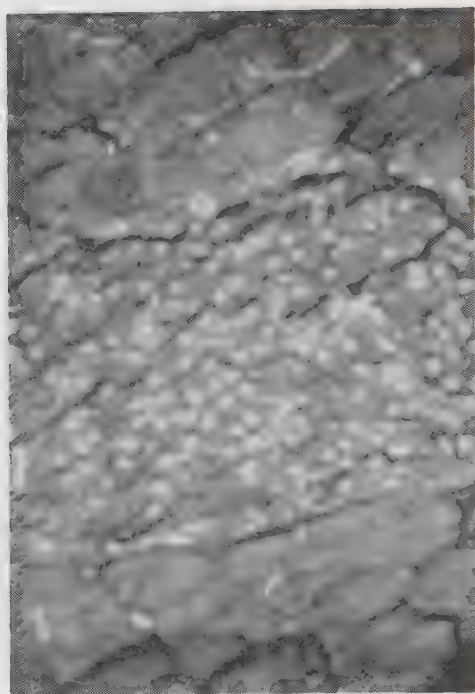


Abb. 4: Pankreas, erhebliche Fluoreszenz der Zellkerne der Inseln, nur geringe Fluoreszenz der Kerne des exkretorischen Parenchyms



Abb. 5: Gehirn, Fluoreszenz der Zellkerne der Leptomeninx und der Kapillaren des Gehirns, vereinzelt auch von Gliazellen unmittelbar unter der Leptomeninx



Abb. 6: Fluoreszenz der Sarkolemmkerne des
Skelettmuskels

LITERATURVERZEICHNIS

- DANN, O., E. HIEKE, H. HAHN, H.-H. MISERRE, G. LÜRDING
und R. RÖSSLER: Trypanocide Diamidine des 2 Phenyl-
thio-naphtens.
Justus Liebig's Ann. Chem. 734, 23
(1970)
- FINK, E. u. O. DANN; in Actes du colloque: Les Moyens
de lutte contre les Trypanosomes
et leurs Vecteurs, 297, Institut
d'Elevage et de Medecine veterinaire
des Pays Tropicaux, Paris 1974
- KADUK, B., H. SCHMIDT u. E. FINK: Myocardial and vascular
lesions due the trypanocide DAPI.
Abstract, XIIth Congress of the
International Academy of Pathology.
Jerusalem, 1978
- KALIWODA, G.: Verteilung und Ausscheidung der try-
panociden Diamidine 6-Amidino-2-
(4-amidinophenyl)indol bei Maus und
Rind sowie 6-Amidino-2-(4-amidino-
phenyl)thionaphten und 5-Amidino-2-
(4-amidinophenyl)benzofuran bei der
Maus.
Dissertation Erlangen-Nürnberg, 1976
- KNÜTTGEN, H.J.: Schlafkrankheit. In Nauck, E.G.:
Lehrbuch der Tropenkrankheiten,
162-180. Stuttgart, 1975
- LOSOS, G.J. and B.O. IKEDE: Review of Pathology of Diseases
in Domestic and Laboratory Animals
caused by Trypanosoma congolense,
vivax, brucei, rhodesiense and
gambiense.
Veterinary Pathology. Suppl. ad
Vol. 9, 1972. S. Karger, Basel
- RAETHER, W. und H. SEIDENATH: Die Wirkung von Berenil und
98/202 in chronisch mit T.rhodesiense
infizierten Bärenmakaken.
Tropenmed. Parasitol. 27, 238 (1976)
- SCHMIDT, H., B. KADUK u. E. FINK: Morphologie der Neben-
wirkungen trypanocider Diamidine.
26. Tagung Europ. Ges. Veterinär-
pathologie, Erlangen 1977.
Abstract: Berl.-Münchn.Tierärztl.
Wschr. 90, 406, 1977.

Lebenslauf

Schuhmacher, Friedrich August Wilhelm

Am 25. März 1952 wurde ich als drittes Kind des praktischen Arztes Dr. med. August Schuhmacher und seiner Ehefrau Frieda, geb. Lutz, in Schillingsfürst geboren.

Dort besuchte ich vier Jahre lang die Volksschule und trat am 1. September 1962 in das mathematisch-naturwissenschaftliche Reichsstadt-Gymnasium in Rothenburg o.d.T. ein, an dem ich mich im Juni 1972 der Reifeprüfung unterzog.

Im Sommersemester 1973 begann ich mit dem Studium der Medizin an der Johannes Gutenberg Universität in Mainz und legte mit Erfolg die Ärztliche Vorprüfung im März 1975 ab.

Seit dem Sommersemester 1975 studierte ich an der Friedrich Alexander Universität in Erlangen, an der ich mich im März 1976 dem 1. Teil und im März 1978 dem 2. Teil der Ärztlichen Prüfung unterzog. Im Rahmen des Praktischen Jahres bin ich in den Kliniken für Chirurgie, Neurologie/Psychiatrie und Innere Medizin der Universität Erlangen vom 17.4.1978 bis 16.3.1979 tätig gewesen.

Am 18./19. April 1979 bestand ich mit Erfolg den 3. schriftlichen Teil der Ärztlichen Prüfung, am 14. Mai 1979 den mündlichen Teil des Dritten Abschnittes der Ärztlichen Prüfung.

Copy-Center 2000

852 ERLANGEN · Obere Karlstr. 30
Tel. 09131-26197